



## 網膜芽細胞腫における増殖能の検討

著者	沼崎 好子
号	2863
発行年	1996
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/21348">http://hdl.handle.net/10097/21348</a>

氏 名（本籍）  
ぬま 沼 さき 崎 よし 好 こ 子

学 位 の 種 類  
博 士 （ 医 学 ）

学 位 記 番 号  
医 第 2 8 6 3 号

学位授与年月日  
平 成 8 年 3 月 8 日

学位授与の条件  
学位規則第4条第2項該当

最 終 学 歴  
昭 和 61 年 3 月 20 日  
秋 田 大 学 医 学 部 卒 業

学 位 論 文 題 目  
網膜芽細胞腫における増殖能の検討

(主 査)  
論文審査委員  
教授 玉 井 信 教授 高 橋 徹  
教授 名 倉 宏

# 論文内容要旨

## 目 的

網膜芽細胞腫は小児眼科領域の重要な悪性腫瘍である。網膜芽細胞腫の予後因子に腫瘍組織の分化度がある。分化度による増殖能を検討することは網膜芽細胞腫の病態，治療方針，予後を考える際意義がある。細胞増殖核抗原：PCNA を用いて細胞増殖能を免疫組織学的に検討し組織型ごとの定量を試みた。また，網膜芽細胞腫は有糸分裂や新生血管に富む腫瘍である。塩基性線維芽細胞増殖因子：bFGF の作用に細胞増殖作用，血管新生作用があることより網膜芽細胞腫における bFGF，FGF 受容体の確認のため免疫組織化学及びウェスタンブロッティングを行った。

## 対 象・方 法

1. 免疫組織化学：網膜芽細胞腫の摘出眼球（9眼，分化型2，中間型4，未分化型3）

PCNA に対する免疫染色及び組織型による定量の試みと，bFGF，FGF 受容体に対する免疫染色

2. ウェスタンブロッティング：網膜芽細胞腫の摘出眼球（5眼，分化型1，中間型2，未分化型2）

bFGF の検出

## 結 果・考 察

1. 免疫組織化学

PCNA に対する免疫染色では全組織型の腫瘍細胞の核が暗褐色～暗紫色に染色された。組織型別比較では未分化型に比べ分化型に陽性率が高い傾向を認めた。定量化するために，組織型別に全細胞数に占める PCNA 陽性細胞数の割合（％）を求め平均した。腫瘍に占める壊死の割合（％），HE 染色での有糸分裂像を示す細胞数を数え，合わせて検討した。PCNA 陽性細胞数の割合（％）は未分化型に比べ分化型に陽性率が高く有意差を認めた。腫瘍に占める壊死の割合（％）は，分化型で高く未分化型で低くなった。HE 染色での有糸分裂像を示す細胞数は分化型に比べ未分化型で有意に多くなった。次に bFGF，FGF 受容体に対する免疫染色を行った。aFGF，FGF5 と交差反応を示さないことを確認した抗 bFGF 抗体で，腫瘍血管，腫瘍内部の所々に染色性を認めた。FGF 受容体に対する免疫染色でも同様に染色した。有糸分裂細胞は未分化型で多かったが，PCNA 陽性細胞は逆に分化型で多かった理由として PCNA は G1～S 期以外の細胞を検出している可能性があること，固定条件で反応性が激減することがある可能性があ

ること、検索した症例が偏っていたことを考えた。

## 2. bFGF のウェスタンブロッティング

5 症例の組織を検索したところ、間接法を行った未分化型一例と、ABC 法で検索した 5 例全部で、単量体とその多量体にあたる部分に複数のバンドの出現をみた。ABC 法で吸収試験を行った。即ち、一次抗体に抗 bFGF 抗体のみを加えたものでは、単量体、2 量体、3 量体、及びその他の多量体にあたると思われる部分にバンドを検出した。一次抗体として、抗 bFGF 抗体に加えて recombinant bFGF を加えたものでは、バンドはすべて消失した。抗体の交差反応の結果と合わせて抗体の特異性は高いと考えられた。従って、標本に現れた複数のバンドは bFGF の多量体である可能性が極めて強いと考えた。

アルカリフォスファターゼ標識二次抗体を用いた間接法でも未分化型の標本に複数のバンドが出現した。recombinant bFGF (16Kb) と同じ分子量のバンドを単量体と考えると、2 量体、4 量体に相当する位置にバンドを認めた。アプライした recombinant bFGF 量からスタンダード曲線を作製した。バンドのデンシティを NIH image を使って定量化しスタンダード曲線から標本蛋白に含まれる bFGF 量を求めた。

## 結 語

筆者は網膜芽細胞腫に免疫組織化学およびウェスタンブロッティングを行い、PCNA 及び bFGF, FGF 受容体の存在を初めて確認した。PCNA の定量を試みたが、増殖細胞マーカーとしての真の評価のためには固定条件、検出方法、判定基準等を検討する必要があると思われた。bFGF 及び FGF 受容体は検索したすべての網膜芽細胞腫に見られ、巣状に局在する特徴を持っていた。網膜芽細胞腫に bFGF が確認されたことで網膜芽細胞腫の病態を解明する一つの手がかりとなる可能性がある。

## 審 査 結 果 の 要 旨

眼科領域における眼内悪性腫瘍，特に小児に発症するものとして最も頻度の高い網膜芽細胞腫について，その細胞学的な特徴を細胞増殖核抗原（PCNA）を指標として免疫組織化学的に行った検討，および塩基性繊維芽細胞増殖因子（basic FGF）とその受容体の腫瘍組織における発現を免疫組織化学的およびウェスタンブロッティングによって確認した研究である。

最初の PCNA を用いた免疫組織化学による腫瘍細胞核の染色性を成書に記載されている組織学的な分化度（分化型，中間型，未分化型）で比較し，定量を試みている。腫瘍の眼内全体像を比較する精力的な研究にも関わらず，残念ながら分化度と一致した結果は得られず，逆に未分化型に比べ分化型に陽性率が高い結果を示した。この結果は PCNA を用いた定量化が難しいこと，増殖細胞マーカーとしての評価のためにはさまざまな条件および判定基準を今後検討する必要があることを示唆している。さらに GFAP やオプシンの免疫染色による腫瘍の特徴も研究した。

第 2 の研究である basic FGF の網膜芽細胞腫組織内での検出とその定量についてであるが未分化型および分化型すべての腫瘍組織に単量体，2 量体，3 量体および多量体にあたると思われるバンドを検出した。さらに未分化型の 1 例からは定量することに成功し，88ng/mg protein と計算された。また，腫瘍内部の所々に巣状に FGF 受容体を検出することもできた。これらの結果は網膜芽細胞腫における初めての検出であった。

以上 2 つの実験結果から今後さらに検討しなければならない問題は多く含まれてるものの，網膜芽細胞腫に関する増殖性を指標とした悪性度の研究として新しい分野を切り開き，知見を得たものであり博士論文として優れた研究である。組織型と結果が逆転してる様に見えるところもあるが，それはさらに研究が必要であることを示している。